

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Philipps-Universität zu Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Untersuchungen
zur Blutartunterscheidung an Hand
des morphologischen Blutbildes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Gundolf Meinhardt
aus Marburg

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Philipps-Universität zu Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Untersuchungen zur Blutartunterscheidung an Hand des morphologischen Blutbildes



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Gundolf Meinhardt

aus Marburg

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 9.5.1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Heuser

Referent: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Korreferent: Doz. Dr. med. W. Dölle

Meiner Mutter in Dankbarkeit gewidmet

I n h a l t

	Seite
A. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
B. <u>Methoden zur mikroskopischen Darstellung von Blutzellen in Blutspuren</u>	2
1. In der Literatur angegebene Methoden zur morphologischen Darstellung und zur Technik der Herstellung der Präparate	2
2. Vergleichende eigene Untersuchungen zur Methodik	5
3. Kritische Beurteilung der einzelnen Methoden	10
C. <u>Artunterschiede im morphologischen Blutbild (Literatur)</u>	12
D. <u>Eigene Versuche</u>	16
1. Vorversuche	16
2. Hauptversuche	20
3. Ergebnisse	21
a) Verhalten der Arteigenheiten im Frischblut	21
b) Verhalten der Arteigenheiten im alternden Trockenblut	22
E. <u>Besprechung</u>	23
F. <u>Zusammenfassung</u>	25
G. <u>Literatur</u>	27

A. Einleitung und Fragestellung

Die Größe der roten Blutkörperchen gibt keinen Aufschluß über die Tiergattung. Bekanntlich sind die roten Blutzellen des Menschen und der Säugetiere im reifen Zustand kernlos, die der Vögel, Amphibien, Reptilien und Fische kernhaltig. Die Erythrozyten haben daher bei der Unterscheidung der Haustierblutarten keinen diagnostischen Wert. Sie geben zwar Aufschluß über die großen Gruppen Säuger- Nichtsäuger, eine Differenzierung zwischen den einzelnen Gattungen der Säugetiere lassen sie aber nicht zu. Die roten Blutkörperchen des Menschen unterscheiden sich morphologisch nicht von denjenigen vieler Säugetiere (UNDRITZ). Außerdem sind die Erythrozyten wesentlich anfälliger gegen zerstörende Einflüsse als die Zellen der "weißen Reihe" (DE BERNARDI). Die eingetrockneten Erythrozyten hämolysieren sehr leicht, wenn sie angefeuchtet werden. Diese Tatsache ist auf schwerste Veränderungen in diesen Zellen beim Eintrocknen zurückzuführen, bei dem die Hämolyssefestigkeit verloren geht (UNDRITZ und HEGG).

In der vorliegenden Arbeit ging es um die Frage der Unterscheidung der verschiedenen Haustierblutarten an Hand des "weißen Blutbildes" beim Blutalterungsprozeß.

Die Anregung kam durch die Arbeit "Die morphologisch - hämatologische und zytologische Untersuchung eingetrockneter Blutflecken" von UNDRITZ und HEGG.

B. Methoden zur mikroskopischen Darstellung
von Blutzellen in Blutspuren

1. In der Literatur angegebene Methoden
zur morphologischen Darstellung und zur
Technik der Herstellung der Präparate

Schon immer war es schwierig, alte Blutspuren in schonender Weise so zu behandeln, daß sie mikroskopisch untersucht werden konnten. Zur Ablösung und mikroskopischen Darstellung von Zellen alter eingetrockneter Blutspuren wurden in der Literatur folgende Methoden angegeben: neben der direkten Epimikroskopie im reflektierten Licht, die nur bei dünnen Blutschichten auf glatten Flächen Erfolg verspricht (u.a. WALCHER), wurde die von DE DOMENICIS angegebene sogenannte "Transmikroskopie" angewendet, wenn die Blutspur fest in die Unterlage eingezogen ist oder sich schlecht ohne Zerstörung entfernen läßt. Dabei versucht man eine "Einbettung" auf dem Spuren-

träger oder eine Übertragung auf durchsichtige Folien. Die in der Literatur angegebenen Methoden der Transmikroskopie sind folgende:

a) Leichtes Erhitzen eines Würfels von isotonischer Gelatine an einer Fläche, die dann auf die Spur aufgepreßt wird, so daß Teile der Blutspur haften; Abnehmen des Würfels nach dem Erkalten. Sodann Übertragung auf einen erwärmten Objektträger durch dessen Anpressen auf die Gelatinefläche (PICCHI).

b) Eine stark visköse Zelloidinlösung (8 %) in Äther - Alkohol 1:1 wird als dünner Film auf das Objekt aufgetragen und später wieder abgelöst (DE DOMENICIS; CEVIDALLI-DALLA VOLTA). Auch eine Gelatine-lösung ist geeignet (WALCHER). Dieses Verfahren ist nach MARIGO schonender für die Blutspur als die Anwendung von Klebefolien (s.u.). Vor der Färbung ist 1-3 Minuten (je nach Färbemethode) in Methanol zu fixieren (MARIGO).

c) Auftropfen eines Tropfens Zelloidinlösung in Azeton oder Amylazetat, Ablösen des Films nach etwa 12 h. Ohne Färbung Übertragen auf Objektträger oder Färbung in 1% Eosinlösung (DE DOMENICIS), die das Zelloidin nicht färbt (ROMANESE und PINOLINI).

d) Bei Blutflecken auf dicker oder bunter Pappe

(DE BERNARDI 1958): mit Hilfe von Streifen Klebefolie wird das Papier in feinen Schichten abgezogen, bis schließlich die Spur ganz in Lamellen entfernt ist.

Danach

1) Fixierung der Papierlamellen auf den Folienstücken in absolutem Alkohol - Chloroform - Eisessig 6:3:1 (Garnoy'sche Flüssigkeit) für 2 h;

2) 30 min in absolutem Alkohol zur Entfernung des Eisessigs;

3) absteigende Alkoholreihe bis zu Wasser;

4) Färbung;

5) fließendes Wasser für 1 h;

6) aufsteigende Alkoholreihe;

7) mindestens 3 x für 15 min in absolutem Alkohol;

8) 20 min Xylol. Die Trägerfolie hat sich spontan gelöst oder wird jetzt abgezogen;

9) Einbetten in Balsam. Sehr brüchige Lamellen können vor der Färbung in Eiweiß - Glyzerin auf Objektträger aufgezogen werden;

e) Modifikation nach MARZIANO: Einlegen der Folie für 1-2 min in Xylol, dann sofort Abklatschen der Schicht auf trockene Objektträger, Trocknen, Färben, Einlegen in Xylol für 10-20 min, Einbetten in Balsam.

Oder: Nach dem Trocknen der Objektträger weiter behandeln wie unter d) 1-6.

Für sehr geringes Trockenblutmaterial empfiehlt DE BERNARDI folgende Technik der Transmikroskopie: Auf-tropfen der Peroxydase-Reagenzien, danach Bedecken mit einer Amylazetat-Zelloidinlösung, Abziehen des Häutchens nach 12 h und Mikroskopieren zwischen 2 Objektträgern. Blutflecken in Papier und Stoff werden mit der Unterlage gefärbt und ohne Gegenfärbung eingebettet.

2. Vergleichende eigene Untersuchungen zur

Methodik

Einige Tropfen frischen menschlichen Blutes wurden auf Glas, Pappe und Holz gebracht und zum Trocknen bei Zimmertemperatur (18-20°) im Institut ausgelegt. Jede der genannten Methoden wurde nun an diesen Trockenblutspureenträgern auf ihre Eignung untersucht.

Zu a) 10 g Gelatinekörner wurden unter Zugabe von 100 ml 0,9% NaCl zum Quellen gebracht und durch Erwärmen bei 40° unter ständigem Rühren aufgelöst. Die 10% Lösung wurde zum Würfel gegossen. Diese Gelatinelösung erwies sich als zu weich in der Kon-

sistenz. Der Würfel behielt nicht seine Form. Er ließ sich nicht auf Spureenträger aufpressen oder abnehmen und war deshalb für den Versuch unbrauchbar. Der gleiche Versuch mit einer hochkonzentrierten Gelatine-lösung (80 g Gelatine, 100 ml 0,9% NaCl) brachte ein wesentlich besseres Ergebnis. Der an einer Fläche erwärmte Würfel aus Gelatine nahm einen Teil der Blutspur, die auf einer Glasplatte aufgestrichen war, gut an. Es erwies sich aber als schwierig, die am Würfel haftende Spur auf einen erwärmten Objektträger zu übertragen, da sich der dünne Gelatinefilm mit der Blutspur schwer von der zähen 80%igen Gelatinemasse des Würfels auf den Objektträger abklatschen ließ.

Mit der gleichen Gelatinemasse wurden alte Blutspuren von Holz und Pappe abgenommen. Die Zahl der anhaftenden Blutschüppchen war gering und nach Übertragen auf den Objektträger und Anfärben nach Pappenheim nicht mikroskopierbar. Unter dem Mikroskop war eine homogen blau angefärbte Gelatineschicht zu sehen und in ihr einzelne dichte Anhäufungen von braunrötlicher Farbe. Diese Anhäufungen waren die Blutschüppchen, die sich nicht angefärbt hatten. In ihnen waren keinerlei Zellstrukturen in Ölimmersionsbetrachtung

unter 1200facher Vergrößerung zu erkennen.

Zu b) 4 g Zelloidin auf 50 ml Äther - Alkohol 1:1 wurde so lange gerührt, bis eine blasenfreie, durchsichtige, homogene Lösung entstanden war. Diese 8%ige Zelloidinlösung wurde dünn auf die angetrocknete Blutspur aufgetragen. Nachdem der Film getrocknet war, wurde versucht, die Zelloidinschicht schonend von der Unterlage abzulösen. Je härter jedoch der Spurenträger war (Pappe - Holz - Glas), desto schwieriger war es, einen zusammenhängenden Film zu erhalten, der gefärbt und mikroskopierte werden konnte. Ein Versuch, mit 10%iger Zelloidinlösung in Äther - Alkohol 1:1 (5 g Zelloidin auf 50 ml Äther - Alkohol 1:1) Blutspuren von Pappe, Holz und Glas abzulösen, zeigte ein besseres Ergebnis. Der Zelloidinfilm löste sich auch von Holz in einem zusammenhängenden Streifen ab. Nach Anfärben mit Eosin 1% war zwar das Hämoglobin angefärbt, Kernstrukturen waren aber nicht sichtbar. Seiner Dicke wegen war der Film der 10% Zelloidinlösung nur schwer in Ölimmersion unter 1200facher Vergrößerung mikroskopierbar.

Nach WALCHER wurde dann eine 40% Gelatinelösung (40 g Gelatine auf 100 ml 0,9% NaCl) bereitet und dünn auf die Blutspuren aufgetragen. Beim Ablösen von

Pappe blieben einzelne Blutschüppchen hängen, nicht so bei Holz. Die Schicht war zu dick. Ein neuer Versuch mit 10% Gelatinelösung, die dünn auf die getrocknete Blutspur aufgetragen und nach 48 h abgelöst worden war, brachte ein sehr gutes Ergebnis. Die Blutspur war von der feuchten Gelatinelösung gut angenommen worden; die Schicht ließ sich mühelos in einem Stück vom Spureenträger ablösen. Der Gelatinefilm wurde nach Art eines Blutausstrichs 25 min mit einer Giemsalösung (10 Tropfen Giemsa auf 10 ml Wasser) bedeckt. Nach Abspülen mit aqua dest. und Trocknen wurde der Film unter Ölimmersion bei 1200facher Vergrößerung mikroskopiert. Der Film hatte aber eine homogen-blaue Farbe angenommen. Bis auf einzelne bräunlich-rötliche Anhäufungen von Blutschüppchen waren keine angefärbten Zellen oder Kerne zu erkennen.

Zu c) Einige Tropfen einer 10% Zelloidinlösung in Äther-Alkohol 1:1, in Amylacetat oder Azeton eingerührt, ergaben einen klaren dünnflüssigen Brei, der nach Auftragen auf die Blutspur antrocknete. Nach 12 h konnte der Film gut abgelöst werden. Immer wieder aber nahm diese Zelloidinschicht eine undurchsichtige weiße Farbe an, die das Färben und Mikroskopieren nicht gestattete.

Zu d) Mit Tesafilm abgelöste Papierlamellen wurden nach Vorschrift von DE BERNARDI behandelt. Von Pappe ließen sich mit Hilfe des Tesafilms gut Lamellen abziehen. Sie waren dann aber entweder so dünn, daß sie dem weiteren Verfahren nicht standhielten, oder aber zu dick, um mikroskopiert werden zu können.

Zu e) Heftpflaster- und Tesafilmstreifen wurden nach der Modifikation von MARZIANO gut auf die ange-trockneten Blutflecken aufgedrückt und dann mit einem kurzen Ruck von dem Spurenträger abgerissen. Auf diese Weise blieben die Blutspuren gut an der Folie kleben. Nach Behandlung mit Xylol und Färbung mit Giemsa wurde unter Ölimmersion bei einer 1200fachen Vergrößerung mikroskopiert. Tesafilm erwies sich als gut geeignete Folie; nach Anfärben waren einige Zellansammlungen mikroskopisch zu erkennen. Heftpflaster war als Folie ganz ungeeignet, da die Gummierung als dicker weißer Belag das Anfärben und Mikroskopieren der Zellen verhinderte.

Zu f) Auch die Methode nach DE BERNARDI für geringes Trockenblutmaterial wurde geprüft. Die Spur wurde mit Giemsa gefärbt, Amylazetat-Zelloidinlösung dünn aufgetragen, nach 12 h als Film abgelöst und unter Ölimmersion bei 1200facher Vergrößerung mikroskopiert.

Auch dabei fanden sich nur amorphe Blutzellmassen, nicht aber einzelne Zellen. Die Zellmassen waren teils mit Giemsa blau angefärbt, teils von bräunlich-rötlicher Farbe. Einzelne Zellstrukturen waren nicht erkennbar.

Ist die Blutspur genügend groß, dann kann man sie mit Hilfe von Präpariernadeln zu Trockenblutschüppchen zerkleinern. Nach KEMPEN härtet man die so gewonnenen Schüppchen mit Azeton. Nach Verdunsten des Azetons gibt man einige Tropfen Periston (4% Polivinylpyrrolidon in NaCl-Lösung) hinzu, das bis zur völligen Lösung der Schüppchen eingerührt wird. Einige Tropfen der Suspension werden dann auf einen Objektträger übertragen und wie bei einem Frischblutpräparat ausgestrichen. Nach Trocknen wird gefärbt. Statt Periston kann man nach MARIGO auch 25% Humanalbumin verwenden.

3. Kritische Beurteilung der einzelnen Methoden

Nach den in der vorliegenden Arbeit gemachten Erfahrungen kommen als Methoden der Transmikroskopie lediglich die von WALCHER und DE BERNARDI in der Modifikation nach MARZIANO in Frage. Sie gewährleisten die Abnahme der Blutspur bei jeder Beschaffenheit des Spurenträgers. Die Methode nach DE BERNARDI in der

Modifikation nach MARZIANO, bei der die Übertragung der Spur auf den Objektträger mit Tesafilm vorgenommen wird, ist der von WALCHER noch vorzuziehen, da die Klebeschicht des Tesafilms die Färbung nicht ungünstig beeinflusst. Bei der Gelatinetechnik nach WALCHER färben sich die Blutteilchen, die sich ja zum Teil in der Gelatinemasse befinden, nicht durchweg an. Ausgenommen die Methoden zur Behandlung von Trockenblutschüppchen sind aber alle diese Arten der Transmikroskopie ungeeignet, wenn es sich um die Differenzierung eines Blutbildes handelt.

Bei allen Verfahren waren mikroskopisch keine Einzelzellen zu sehen. Die Ursache lag wahrscheinlich in der Beschaffenheit der Blutspuren. Durch Fibrin werden die Zellen des Blutes beim Antrocknen zusammengeballt. Die so verklebten Zellen ließen sich, auch wenn noch so dünn von der Spur abgenommen wurde, nicht einzeln anfärben und mikroskopisch erkennen. Sie lagen in Haufen über- und nebeneinander. Die Methoden zur Behandlung von Trockenblutschüppchen erwiesen sich als in jeder Weise den vorher besprochenen Arten der Transmikroskopie überlegen. Die Auflösung der geballten Zellhaufen ergab im Ausstrich ein sehr gut anfärbbares und mikroskopierbares Blutbild.

C. Artunterschiede im morphologischen Blutbild

Es wurden Blutmuster von neun Haustieren und vom Menschen untersucht. So erscheinen in der Tabelle I nur diese neun Tierarten.

	UNDRITZ und HEGG	SCHERMER	WIRTH	BAUER-SIC	FERRARA
Hund	Granula der Basophilien selbst mit Toluidinblau nur schwer darstellbar. Eosinophile weisen chromophobe, zytoplasmatische Vakuolen auf. Spärliche Granula in den Eosinophilen und Neutrophilen.	Basophile: sehr selten; plumper, gelappter Kern; im Plasma nur einige ziemlich grobe, schwarzviolette Granula. Granula der Eosinophilen stets rund und von verschiedener Größe. Neutrophile mit sehr wenig granuliertem Plasma. Lymphozyten, unter denen die kleinen überwiegen.	Basophile: in geringerer Zahl vorhanden, als bei anderen Haustieren. Neutrophile in größerer Zahl als beim Pferd. Lymphozyten allgemein an Zahl geringer.	Neutrophile zeigen ein negatives Verhalten auf alkalische Phosphatase-Reaktion. Peroxydase-Reaktion schwach positiv. Monozyten z.T. tief eingebuchtet.	Eosinophile weisen spärliche Granula auf, außerdem kommen chromophobe zytoplasmatische Vakuolen vor. Neutrophile haben ebenfalls wenige Granula.
Katze	Für Katzenarten allgemein: Eosinophile sind streng peroxydase-negativ.	Basophile: sehr selten im Blut erwachsener Tiere. Eosinophile: meist zwei-segmentierter Kern, Hufeisenform, deutliche Granulation. Neutrophile: Kern gewunden. Ring- und Hufeisenform. Granula sehr fein und zart. Peroxydase-Reaktion bei ihnen positiv.	Eosinophile: Granula rund oder stäbchenartig. Neutrophile: besonders feine Granulation, erscheinen oft ungranuliert.	Eosinophile geben eine negative Reaktion auf alkalische Phosphatase und Peroxydase.	

	UNDRITZ-HRGG	SCHERWER	WIRTH	BAUER-SIG	FERRARA
Pferd	Eosinophile haben riesige Granula.		Basophile und Eosinophile und auch deren Granula besonders groß. Neutrophile überwiegen unter den Leukozyten.	Eosinophile haben besonders große Granula. Die alkalische Phosphatase-Reaktion stark positiv, die Peroxydase-Reaktion schwach positiv.	
Schaf	Die Lymphozyten zeigen grobe Solitärganula.	Basophile: Kern gelappt, zeigt eigenartige, orangegebläute rote Farbe. Eosinophile: grobe und dichte Granulation. Ziemlich hoher Prozentsatz unter den Leukozyten. Neutrophile: weniger als Lymphozyten. Übersegmentierter Kern, vielfach gewunden. Lymphozyten: auffallende, große und dunkelrot gefärbte Azurgranula.	Basophile: auffallend klein. Neutrophile: Zahl besonders gering, sehr starke Segmentierung.	Neutrophile: sehr häufig übersegmentiert.	Eosinophile: in großer Zahl wegen Parasitenbefalls. Neutrophile: starke Kernsegmentierung. Monozyten: Polymorphismus der Kerne. Lymphozyten: grobe Azurgranula im Zytoplasma der Lymphozyten.
Ziege	Wie bei Schaf.		Basophile: sehr wenige an Zahl	Neutrophile: gleiches Verhalten wie beim Schaf.	
Schwein			Basophile und Eosinophile relativ klein. Leukozyten an Zahl sehr hoch.	Neutrophile: häufiger Stabkernige im Verhältnis zu anderen Haustieren.	

	UNDRITZ-HEGG	SCHERNER	WIRTH	BAUER-SIC	FERRARA
Rind			Neutrophile: in verhältnismäßig großer Anzahl unter den Leukozyten: überluphozyten: überwiegen an Zahl.	Basophile: Kerne von Kastanienblätterform. Eosinophile: alkalische Phosphatase-Reaktion schwach positiv, ebenfalls Peroxydase-Reaktion.	
Kaninchen	Neutrophile mit pseudoeosinophiler Granulation.	Basophile: Kern von Granulation oft vollständig verdeckt. Eosinophile: Kern deutlich segmentiert, Peroxydase-Reaktion positiv. Neutrophile: Kern stark segmentiert und pyknotisch. Starke Anfärbarkeit der Granula mit Eosin, deshalb: Pseudoeosinophile (EHRLLICH).	Neutrophile: keine normalen Neutrophilen, stattdessen Pseudoeosinophile.		Eosinophile: Größer als Pseudoeosinophile, zweilappiger Kern, größere und spärlichere Granulation. Neutrophile: Keine eigentlichen, sondern Pseudoeosinophile. Häufige Pelgeranomalie.
Huhn	Eosinophile: haben spezifisch kleinere, runde Granula, nehmen stark die Färbung an.	Basophile: zeigen deutlich große, runde Kerne, Eosinophile: nur deren Granula zeigen positive Peroxydase-Reaktion. Neutrophile: gelbe rote Stäbchen der Pseudoeosinophilen. Vereinzelte Plasmazellen und Myelozyten.	Es kann ohne Krankheit zu starker Vermehrung der weißen Blutkörperchen kommen.	Neutrophile: zeigen Pseudoeosinophile Granulation.	Eosinophile: haben spezifische, kleinere, runde, vereinzelte Granula mit ebenfalls starker Färbung. Vorkommen von Pseudoeosinophilen oder Amphophilen statt Neutrophiler.

D. Eigene Versuche

1. Vorversuche

Blut von Pferd, Rind, Schwein, Schaf, Ziege, Hund, Katze, Kaninchen, Huhn und vom Menschen wurde frisch entnommen, mit Zitrat versetzt und in Petrischalen (Schichtdicke 2-3mm) gegossen⁺). Innerhalb von 24 h trocknete das Blut bei Zimmertemperatur (18 - 20°) ein. Dann wurde ein Blutschüppchen nach MARIGO auf eine Tüpfelplatte gebracht und mit Präpariernadeln zu kleinen Trockenschüppchen zerkleinert. Nun wurde ein Tropfen Humanalbumin zugesetzt und so lange gerührt, bis eine homogene dunkelrot-braune Flüssigkeit entstanden war. Ein Tropfen des so gelösten Blutes wurde auf einen sauberen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas in Form von Frischblutpräparaten ausgestrichen. Sodann wurde nach Pappenheim angefärbt: das luftgetrocknete Präparat wurde 3 min mit May-Grünwald-Lösung fixiert und nach Zusatz der gleichen Menge neutralisierten destillierten Wassers noch 1 min gefärbt. Hierauf wurde die Farblösung abgegossen, und ohne nochmalige Spülung frisch hergestellte, verdünnte wässrige Giemsalösung (10 Tropfen auf 10 ml Wasser) aufgegossen, und 20 min

⁺) An dieser Stelle möchte ich den verantwortlichen Mitarbeitern der Behring-Werke Marburg und des Schlachthofs Marburg meinen besonderen Dank für die freundliche Überlassung von Tierblut aussprechen.

lang gefärbt. Dann wurde gründlich mit Wasser abgespült und der Ausstrich senkrecht zum Trocknen an der Luft aufgestellt. Nach dem Trocknen wurde mit Öl-immersion und 1 200facher Vergrößerung mikroskopiert. Die Betrachtung des 1 Tag alten, nach MARIKO behandelten Trockenblutes ergab, daß einzelne Zellen sehr gut zur Darstellung kamen, andere stark unter der Behandlung gelitten hatten. Manche Zellverbände waren durch das Humanalbumin nicht aufgelöst worden. Ausstriche von Trockenblut, die nach der Methode von KEMPEN, bei der statt Humanalbumin Periston verwendet wird, angefertigt wurden, brachten wesentlich bessere Ergebnisse. Dabei wurden die Blutschüppchen auch vor Zugabe von Periston mit Azeton gehärtet, was nach KEMPEN die Zellen vor Behandlungsschäden schützen soll.

In Periston lösten sich die Blutschüppchen am schnellsten und vollständigsten, so daß das wenig schonende Zerkleinern der Schüppchen nicht mehr notwendig war. Nach dem Ausstreichen, Färben und Trocknen der Präparate zeigten sich unter dem Mikroskop sehr gut erhaltene Zellen der "weißen Reihe", die beinahe nicht von denen des Frischblutes zu unterscheiden waren.

Auf Anraten von Frau Priv.-Doz. Dr. BAUER-SIC (Institut für Biochemie und Endokrinologie der Haustiere der Universität Giessen) wurde erneut Tierblut

entnommen und diesmal nicht zur Gerinnungshemmung mit Zitrat versetzt, sondern mit der Flüssigkeit nach WINTROBE (1,2 g Ammoniumoxalat, 0,8 g Kaliumoxalat, 1,2 ml Formalin 40%, Aqua dest. ad 100,0 ml), die für die Zellen schonender ist als Zitrat. In einer Versuchsreihe wurde Blut von Pferd, Rind, Schwein, Ziege, Schaf, Kaninchen, Katze und Hund, sowie vom Menschen mit der Flüssigkeit nach WINTROBE (0,5 ccm für 5 ccm Blut) versetzt⁺). Im Institut wurde das Blut in Schalen ausgegossen (2-3 mm Schichtdicke) und zum Trocknen bei Zimmertemperatur (18-20°) aufgestellt. Im Abstand von 2 Tagen wurden die Trockenschüppchen in der oben angegebenen Art über 10 Tage lang nach KEMPEN aufbereitet, gefärbt und unter dem Mikroskop differenziert. Dabei wurden je 200 Zellen ausgezählt, ganz wie beim Frischblutausstrich. Die gefundenen Zellzahlen des jeweils im Abstand von 2 Tagen untersuchten Trockenblutes sollten Aufschluß darüber geben, wie sich diese Zellzahlen zu denen der im Frischblut ausgezählten verhalten. Es sollte also geprüft werden, ob Zellen zugrundegegangen waren, oder der Untersucher auf Grund eines sich etwas wandelnden morphologischen Zellbildes Täuschungen ausgesetzt wurde. Um eine breite Basis für die Unterscheidung der Besonderheiten der einzelnen Tierblutarten an Hand der Darstellung ihrer Leukozyten zu gewinnen, wurde die Färbung nach PAPPENHEIM gewählt.

⁺) Hier möchte ich Frau Priv.-Doz. Dr. BAUER-SIC für ihre freundliche Hilfe meinen besten Dank aussprechen

Folgende Zellzahlen in Prozent wurden gefunden:

Pferd

Normalwerte nach WIRTH	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas. 0,5%	2	0	0	1	1	0
Eos. 3%	5	5	4	7	4	5
Neutr. 60%	58	61	57	55	44	41
Lymphoz. 35%	33	34	34	41	51	54
Monoz. 3%	2	0	0	1	0	0

Schwein

Normalwerte nach WIRTH	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas. 0,1%	0	0	0	0	0	0
Eos. 0,4%	1	1	0	1	0	0
Neutr. 72,9%	28	30	31	15	26	19
Lymphoz. 23,9%	69	69	68	84	74	81
Monoz. 0,9%	2	0	1	0	0	0

Rind

Normalwerte nach WIRTH	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas. 0,1%	0	0	1	0	0	0
Eos. 6%	1	0	2	0	3	1
Neutr. 30%	36	35	30	20	32	29
Lymphoz. 50%	63	65	68	80	65	70
Monoz. 5%	0	0	0	0	0	0

Hund

Normalwerte nach SCHERMER	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas. 0-1%	0	0	0	0	0	0
Eos. 0-14%	2	1	1	1	3	3
Neutr. 42-77%	55	54	48	44	31	45
Lymphoz. 9-50%	36	39	51	54	66	51
Monozy. 1-6%	7	6	0	0	0	1

Schaf

Normalwerte nach SCHERMER	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas. 0,8%	0	0	0	0	0	0
Eos. 10%	20	15	5	12	15	25
Neutr. 35%	25	35	33	32	18	19
Lymphoz. 53%	54	50	61	55	67	56
Monozy. 2%	1	0	1	1	0	0

Ziege

Normalwerte keine Lit.- Angabe	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas.	0	0	0	0	0	0
Eos.	0	1	1	0	0	0
Neutr.	28	26	25	24	25	29
Lymphoz.	71	72	74	76	74	71
Monozy.	1	1	0	0	1	0

Kaninchen

Normalwerte nach SCHERMER	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas. 0,5-3,0%	0	1	0	0	0	0
Eos. 1-3%	2	3	2	1	1	2
Neutr. 8-50%	36	14	36	19	13	12
Lymphoz. 20-90%	56	82	62	80	87	86
Monoz. 1-4%	4	0	0	0	0	0

Katze

Normalwerte nach SCHERMER	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas. 0,5%	0	0	0	0	0	0
Eos. 4,2%	10	1	3	3	1	2
Neutr. 61%	8	50	41	45	33	26
Lymphoz. 31,6%	82	46	56	52	66	72
Monoz. 1,8%	0	3	0	0	0	0

Mensch

Normalwerte nach MÜLLER- SEIFERT	frisch	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage
Bas. 0-1%	0	0	0	0	0	0
Eos. 1-3%	3	4	2	2	1	2
Neutr. 50-70%	68	48	64	71	45	53
Lymphoz. 22-25%	28	47	44	27	54	45
Monoz. 4-8%	1	1	0	0	0	0



Aus der Aufstellung geht hervor, daß die Zahlen, besonders die der Neutrophilen und Lymphozyten große Schwankungen zeigten. Das überwiegend beobachtete "Ansteigen" der Lymphozyten und der "Abfall" der Neutrophilen lag in der Verwechslung der beiden Zellarten begründet. Die Alterungsformen der Zellen, besonders der segmentierten Neutrophilen, sahen im nach KEMPEN behandelten Trockenblut wie Lymphozyten aus, da die Segmente der Neutrophilen durch die Alterung, wahrscheinlich aber noch mehr durch die Aufbereitung, zusammenklumpten. Aus der Aufstellung geht weiter hervor, daß auch die anderen Zellen der "weißen Reihe" Schwankungen aufwiesen. Besonders die Monozyten konnten nur noch ganz selten mit Sicherheit als solche bestimmt werden.

Nicht einmal die Normalwerte der Blutzellen für die einzelnen Tierarten können Aufschluß über die Tierart geben, da das Blutsystem der Tiere nach WIRTH ganz allgemein sehr labil ist und auf die verschiedensten, irgendwie einwirkenden, nicht immer sicher erkennbaren Reize rasch mit Veränderungen reagiert. Hinzu kommt, daß bei den Haustieren oft sehr starke Rassenverschiedenheiten bestehen. Auch bei unsauberer Haltung der Tiere können erhebliche Veränderungen der Blutnorm eintreten.

2. Hauptversuche

In einer folgenden Versuchsreihe wurde auf Anraten von UNDRITZ⁺⁾ das Blut nicht mehr mit einer gerinnungshemmenden Flüssigkeit versetzt. Auch wurde nun das Blut nicht in Schalen zum Trocknen ausgegossen, sondern am Ort der Entnahme auf Stoff (Wollstoff) aufgetropft. Dies sollte verhindern, daß die Leukozyten (wie in den Schalen) zum Boden niedersanken und sich dort ansammelten. Ferner wurde nicht mehr Periston als Lösungsmittel benutzt, sondern Rinderalbumin, da Periston nach UNDRITZ (pers. Mitt.) die Zellen angreift.

Frisch vom Tier und Menschen entnommenes Blut wurde auf ein Stückchen Wollstoff aufgetropft. Innerhalb von 24 h trocknete das Blut bei Zimmertemperatur (18-20°) zu Krusten ein. An eine Frischblutuntersuchung wurde die erste Trockenblutuntersuchung in der Technik nach UNDRITZ nach 24 h angeschlossen. Der blutbefleckte Wollstoff wurde über einen sauberen Objektträger gehalten, und das trockene Blut wurde mit einer Präpariernadel vorsichtig abgekratzt, bis einige kleine Schüppchen auf umschriebener Stelle beisammen lagen. Dann wurde ein Tropfen Albumin außerhalb dieser Stelle auf den Objektträger aufgetropft. Eine Spur des Tropfens wurde mit einer Präpariernadel in das Feld hineinge-

⁺⁾ An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr.med.E.Undritz für seine freundliche Hilfe meinen besten Dank aussprechen

zogen und schnell mit den Schüppchen vermischt, bis sich diese einigermaßen aufgelöst hatten. Der entstandene Blutklecks wurde dann mit einem Deckglas vorsichtig wie beim Frischblutpräparat ausgestrichen. Nach dem Trocknen wurde der Ausstrich nach Pappenheim gefärbt. Der luftgetrocknete Ausstrich wurde unter Ölimmersion bei 1200facher Vergrößerung untersucht.

Das Leukozytenbild wurde über 105 Tage hinweg anfangs alle 2 Tage, nach 1 Woche alle weiteren 8 Tage verfolgt. Wie in den Vorversuchen, wurde auch hier die Pappenheim-Färbung (May-Grünwald-Giemsa) gewählt, um eine breite Basis für die Unterscheidung der Besonderheiten der einzelnen Tierblutarten an Hand der Darstellung ihrer Leukozyten zu gewinnen.

3. Ergebnisse

a) Verhalten der Arteigenheiten im Frischblut

Das Frischblutbild erbrachte folgende Eigenschaften der einzelnen Blutarten. Beim Pferd zeigten sich riesige Granula in den Eosinophilen. Rinder, Schafe und Ziegen hatten sehr kleine Erythrozyten. Nach SCHERMER, WIRTH, FERRARA und BAUER-SIC soll das Schaf Neutrophile mit

einer Übersegmentierung haben, was aber nur annähernd bestätigt werden konnte. In den Lymphozyten des Schafes fanden sich grobe Solitärgranula (so auch UNDRITZ). In den Kaninchen-Neutrophilen konnten die pseudoeosinophilen Granula nachgewiesen werden. Das von BAUER-SIC angegebene spezifische Merkmal einer besonders starken Einbuchtung der Monozyten des Hundes oder die auffallend schlechte Anfärbbarkeit der Basophilen des Hundes mit Toluidinblau (UNDRITZ) gestattete keine sichere Unterscheidung gegenüber anderen Blutarten. Schwein und Katze zeigten bei dieser Färbung keinerlei typische Unterscheidungsmerkmale. Hühnerblut war wegen kernhaltiger Erythrozyten gut erkennbar.

b) Verhalten der Arteigenheiten im alternden

Trockenblut

Die Granula der Eosinophilen des Pferdes blieben über die Zeit der Untersuchung deutlich erhalten. Die Möglichkeit der Identifizierung von Rinder-, Schaf- und Ziegenblut an Hand der auffälligen Kleinheit ihrer Erythrozyten entfiel, weil die Zellmembranen durch den Alterungs- und Aufbereitungsprozess vermutlich rasch zerstört worden waren. Auch die Übersegmentierung der Neutrophilen des Schafes verlor schon nach 2 Tagen

völlig ihre Bedeutung, da die Segmente miteinander verklebten und verklumpten. Die von UNDRITZ angegebenen groben Solitärgranula in den Lymphozyten des Schafes konnten im Trockenblut nicht als typisches Merkmal wiedergefunden werden. Ein sehr hoher Prozentsatz an Eosinophilen beim Schaf (SCHERMER) ist gegenüber anderen Tierarten kein sicheres Merkmal, da die Zahlen - wie oben angegeben - starken Schwankungen unterliegen. Die pseudoeosinophilen Granula der Neutrophilen des Kaninchens waren schon nach 2 Tagen nicht mehr aufzufinden. Hühnerblut war seiner kernhaltigen Erythrozyten wegen jederzeit von dem eines anderen Tieres mühelos zu unterscheiden.

E. Besprechung

Aus den Ergebnissen der Hauptversuche geht hervor, daß die Zellen als solche mit Einschränkungen über die ganze Versuchszeit erhalten blieben und mikroskopisch zu erkennen waren. Es ging aber um die Spezifität der morphologischen und mit der Pappenheim-Färbung darstellbaren, typischen Merkmale der Leukozyten der verschiedenen Blutarten. Dabei brachten die Ergebnisse des nach UNDRITZ behandelten Trockenblutes gegenüber denen des Frischblutes ein negatives Resultat.

MURINO und Andere kamen bei der Behandlung von altem, eingetrocknetem Blut zu dem gleichen Ergebnis. Sie fanden, daß Zellelemente eines so behandelten Blutes derartige Veränderungen zeigten, daß nur noch die einfache Unterscheidung zwischen Monozyten und Vielkernigen möglich war. Es ist WILLEME-PISSART und MOUREAU zuzustimmen, daß die einmal in das verkrustete Blut eingeschlossenen Blutkörperchen sich dort für längere Zeit nicht wesentlich in ihrer Struktur ändern. Gegenüber den Leukozyten des Frischblutes verändern sich aber die des Trockenblutes in den ersten 4-6 Tagen sehr eindrucksvoll. Gerade die spezifischen Merkmale der Blutarten gehen in dieser Zeit ziemlich verloren. MOSINGER und Andere untersuchten Veränderungen an einem Gemisch von Blut- und Leberzellen. Sie konnten dabei eine sichere zytologische Diagnose nur bei bis zu 3 Monate alten Bluten stellen. Zweifellos könnte die Untersuchung der Leukozyten eine gute Zusatzmethode zu den Methoden der serologischen Artbestimmung darstellen. Die Ergebnisse zeigten aber, daß die morphologische Methode der Blutartbestimmung in der gerichtsmedizinischen Spurenuntersuchung nicht von Bedeutung sein kann. So geben auch MURINO und Andere an, daß die von UNDRITZ und HEGG beschriebene Methode in der Praxis des hämatologischen Laboratoriums nicht den Wert einer Standardmethode für die allgemeine Blutdiagnose oder für die Feststellung der Tierart, der das Blut zugehört, besitzen kann.

F. Zusammenfassung

Aufgabe der Arbeit war zunächst eine Zusammenstellung aller älteren und neueren Literaturmitteilungen über die Speciesdifferenzierung aus dem Blutbild. Aktueller Anlaß war die Behauptung in einem aufsehenerregenden Strafprozeß, aus dem zytologischen Bild von Blutflecken lasse sich Menschenblut diagnostizieren.

Die eigenen Untersuchungen der spezifischen Art-eigenheiten von verschiedenen Haustierbluten und Menschenblut in gealterten Trockenflecken erbrachten folgende Ergebnisse: Die Eosinophilen des Pferdes blieben über 3 Monate hin deutlich erhalten. Die Kleinheit von Rinder-, Schaf- und Ziegenerythrozyten machte die Differenzierung unmöglich, außerdem zerfallen Erythrozyten rasch. Die übersegmentierten Granulozyten des Schafes verloren nach 2 Tagen ihre diagnostische Bedeutung, da die Segmente verklumpten; die groben Solitärgranula in den Lymphozyten waren nicht mehr im Trockenblut differenzierbar. Der gegenüber anderen Tieren hohe Prozentsatz an Eosinophilen des Schafblutes war wegen großer physiologischer Schwankungsbreite nicht differentialdiagnostisch verwertbar. Pseudoeosinophile Granula in den Segmentkernigen des Kaninchens waren nach 2 Tagen schon nicht mehr aufzufinden. Hühnerblut

blieb seiner kernhaltigen Erythrozyten wegen gut differenzierbar. Mit diesen Ergebnissen wurden die Angaben der Literatur teils bestätigt, teils widerlegt, teils erweitert.

Ein vorbereitender Teil der Arbeit, befasste sich mit den Methoden zur Herstellung mikroskopischer Präparate aus alten Blutflecken. Als geeignet zur Übertragung der Blutspuren von jedem Spureenträger erwiesen sich nur die Verfahren mit Hilfe einer Gelatinelösung und von Tesafilm. Eine Differenzierung des Blutbildes war aber bei allen Methoden der Transmikroskopie nicht möglich. Ihnen überlegen war die Aufbereitung der Blutschüppchen in Periston nach KEMPEN.

G. Literatur

- Bauer-Sic, P.: pers. Mitt.
 De Bernardi, A.: L'esame dei globuli bianchi in macchie di sangue su carta di vario tipo: una utile variazione della epitrasopia. Min. medicoleg. 78, 205, 1958
 De Bernardi, A.: Nuovo metodo per l'esame di macchie infiltranti profondamente il legno, con particolare riferimento al sangue e allo sperma. Min. medicoleg. 79, 29, 1959
 Cevidalli, A.; e A. Dalla Volta: Il metodo morfologico nella diagnosi medicolegale di sangue etc. Haematologica 4, 217, 1923
 Ferrara, A.: Vergleichende Morphologie des Blutes der Laboratoriumstiere, in Band 1, Teil I: ("Allgemeine Hämatologie") des "Handbuchs der gesamten Hämatologie" von L. Heilmeyer und A. Hittmair München (Urban & Schwarzenberg) 1957
 Kempen, P.: Untersuchungen zur Blutalters- und Geschlechtsbestimmung an Blutschüppchen. Diss. Bonn 1961
 Marigo, M.: Sulla validità di alcuni metodi istologici, istochimici e citologici nell'identificazione delle tracce di sangue. Riv. Med. leg. 4, 311, 1962
 Marziano, E.: Particolare procedimento di tecnica per il prelievo e la identificazione di tracce di sangue. Min. medicoleg. 82, 297, 1962
 Mosinger, M. u. A.: Sur l'étude des taches de sang. Acta Med. Leg. soc. (Liège) 17 Nr. 2, 51, 1964
 Moureau, P. und F. Willeme-Pissart: Examen cytologique des taches biologiques. Acta Med. Leg. 3, 31, 1964
 Murino, P. u. A.: Über die Möglichkeit der Erkennung von Zelementen in Blutflecken nicht frischen Datums. Acta Med. leg. 17, 29, 1964
 Müller, F.-Seifert, O.: Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik, 68 München (Bergmann) 1962
 Picchi, L.: Di un semplice artificio ... per l'esame .. delle macchie di sangue. Arch. Antropol. crim. 48, 492, 1928; Ref. Z. gerichtl. Med. 13, 125, 1929

- Romanese, R., e
G. Pinolini: Osservazioni comparative sul valore dei
metodi della epimicroscopia etc.
Arch. Antropol. crim. 42, 149, 1922; Ref.
Z. gerichtl. Med. 2, 476, 1923
- Schermer, S.: Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere,
Leipzig (Barth) 1958
- Undritz, E.: Herstellung von Blut- und Knochenmarks-
ausstrichen. "Triangel", Sandoz-Z. für
med. Wiss. 4, 36, 1959
- Undritz, E.
und P. Hegg: Die morphologisch-hämatologische und
zytologische Untersuchung eingetrockneter
Blutflecken.
Schweiz. med. Wschr. 89, 1088, 1959
- Undritz, E.
und P. Hegg: Die morphologische Untersuchung einge-
trockneter Blutflecken II. Anwendung an
einem Beispiel.
Schweiz. med. Wschr. 90, 1223, 1960
- Undritz, E.
und P. Hegg: Die morphologische Untersuchung einge-
trockneter Blutflecken und ihre forensische
Bedeutung.
Wien. med. Wschr. 112, 294, 1962
- Walcher, K.: Gerichtlich-medizinische und krimi-
nalistische Blutuntersuchung. Berlin
(Springer) 1939
- Wirth, D.: Grundlagen einer klinischen Hämatologie der
Haustiere. 2 Wien-Innsbruck
(Urban & Schwarzenberg) 1950

Herrn Professor Dr. med. F. Schleyer danke ich
für die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Gerichtliche
Medizin der Universität Marburg und für die Überlassung
des Themas, seine Beratung bei den Versuchen und bei
der Abfassung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 16. Juni 1940 wurde ich als zweiter Sohn des Arztes Dr. med. Fritz Meinhardt und seiner Frau Rita, geb. von Frankenberg, in Gera geboren.

Von 1946 bis 1952 besuchte ich die Dorfschule in Gera-Milbitz, die zwei restlichen Jahre die Grundschule in Gera-Untermhaus.

Von 1955 bis 1959 war ich Schüler der Oberschule II in Gera, an der ich am 10.6.1959 die Reifeprüfung bestand.

Nach dem Abitur verließ ich die Ostzone. Am 27.4.1960 legte ich in Tübingen-Einsiedel die Sonderprüfung für die Zulassung zum Hochschulstudium ab.

Ab Sommersemester 1960 studierte ich an der Universität Tübingen Medizin und bestand am 2.4.1963 die ärztliche Vorprüfung. Nach einem weiteren Semester in Tübingen studierte ich ein Wintersemester in Wien. Von 1964 bis 1966 war ich Student der Universität Marburg, wo ich am 12.10.1966 das Staatsexamen bestand.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

in Tübingen:

Bartels, Brecht, Feneis, Tonutti, Weitzel

in Wien:

Brücke, Chiari, Fellingner, Fuchsig, Moritsch

in Marburg:

Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Buchholz,
Dölle, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann, Jacob,
Linneweh, Martini, Neubauer, Rohen, Sauer,
Schleyer, Schmid, Schwaiger, Siegert, Straub,
Streicher, Würterle



